

	オノデラ ノゾミ
<b>氏 名</b>	<b>小野寺 望</b>
本籍（国籍）	岩手県
学位の種類	博士（学術）
学位記番号	連研第 648 号
学位授与年月日	平成 27 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	寒冷圏生命システム学 熱・生命システム学
<b>学位論文題目</b>	
	ニワトリ胚の脳において高度に発現する軸索性 RNA (Axonal RNAs highly expressed in the brain of chicken embryos)
学位審査委員	主査 教授 富田 浩史 副査 准教授 荒木 功人 副査 准教授 西野 敦雄 副査 教授 木村 直子 副査 准教授 中牟田 信明

## 論文の内容の要旨

筆者はニワトリ後期胚の中脳視蓋SGCから延髄に投射する神経軸索、中脳視蓋に投射する恐らく鼻側網膜に由来する視神経軸索、端脳中央部に投射する軸索に、通常のISHにより容易に検出が可能な高いレベルで軸索性RNAが存在することを見出した。このような高レベル軸索性RNAが同じぐらいの発生段階のマウスの脳で検出できるかに関し、少数の遺伝子に関し解析を行ったが、マウスでは検出されなかった。マウスでは古典的なISHでは、非常に弱いシグナルしか検出できない軸索性mRNAが機能していることが示されている (Ji & Jaffrey, 2012) ので、局所的翻訳が見逃されている可能性があると考えられる。

哺乳類細胞ではZBP1の存在量が軸索性RNAの量を制限しているという報告 (Donnelly et al. 2011) があり、そのことがマウスで高レベルの軸索性RNAが検出されないことと関係があるのかもしれない。軸索性mRNAは軸索再生にも寄与するので、軸索性mRNAの量が制限されていることは軸索再生能力の制限につながっている可能性がある。Xenopusオタマジャクシ幼生の視神経は再生することが知られており、またXenopusの網膜神経節細胞軸索でラミン B2 mRNAが高いレベルで存在することを考え合わせると、ニワトリ後期胚で高レベル軸索性mRNAを有するニューロンの軸索再生能が哺乳類に比べ高いかどうか、興味のあるところである。この観点から、ニワトリの高レベル軸索性RNAの局在機構を明らかにすることは、軸索再生研究に貢献するかもしれない。

更に筆者は、ニワトリ後期胚の脳において、Scratch2とAPPに関し、アンチセンスRNAが存在し、それらの分布が高レベル軸索性mRNAと一部重複する、もしくは同じ分布をすることを見出した。本研究で調べた発生段階では、Scratch2およびAPPタンパク質は軸索で検出

できなかった。このことは高レベル軸索性mRNAを有する軸索において翻訳調節が行われていることを示唆する。筆者が同定した軸索性アンチセンスRNAがどのような構造をとっているか、あるいはそれがmiRNAへとプロセッシングされるのかについては不明であるが、何らかの形でそのような翻訳調節に関与している可能性はある。

Scratch2はマウス大脳皮質において神経前駆細胞の移動に関与することが示されている (Itoh et al., 2013)。もし、軸索性Scratch2 mRNAが翻訳されるとしても、その機能は細胞移動とは関係しない可能性が高いと考えられる。

軸索における局所的翻訳は、外部刺激により引き起こされる。この観点からBDNFやNT-3のようなニューロトロフィンのmRNAが高レベル軸索性mRNAとして検出されたことは興味深い。軸索性ニューロトロフィンmRNAは、局所的翻訳に関し自己フィードバックループを形成しているのかもしれない。

筆者はヒストンH1F0の軸索性mRNAも検出した。ヒストンmRNAは軸索には存在しないとされてきたが (Taylor et al., 2005)、より最近、ラットの背根神経節軸索において、H1F0を含む幾つかのヒストンのmRNAが検出されている (Gumy et al., 2011)。仮にヒストンが軸索で局所的に翻訳されたとして、それがどのような機能を持つかは不明である。

本研究で同定した高レベル軸索性RNAの由来が細胞体由来のものか、それともグリアなど周囲の細胞に由来するものかは不明である。これらの軸索が由来するニューロンは、その分布から判断するに、何れも投射ニューロンである。中脳視蓋SGC付近から延髄に伸びる高レベル軸索性RNA陽性軸索の場合、ISHのシグナルパターンと脂溶性蛍光標識による逆行性標識実験より、少なくとも一部はニューロピリン1陽性ニューロンおよび/またはコリンアセチルトランスフェラーゼ陽性ニューロンを含む大型投射ニューロンである可能性が高いと思われる (Yamagata et al., 2006)。

更に、筆者は後期胚の中脳視蓋SGC中の大型投射ニューロンの前駆体候補であるDTmesVニューロンがGAP-43陰性であることを発見した (Onodera et al., 2013)。GAP-43は軸索伸長に重要であるとされているので、これは予想外の発見であったが、GAP-43と構造は異なるものの機能的に相同であるCAP-23/Basp1が、DTmesVニューロンで機能しているのかもしれない。あるいは、DTmesVニューロンではGAP-43が他のニューロンと異なる翻訳後修飾をうけるのかもしれない。

シャルコー・マリートゥース病、脆弱X症候群、脊髄性筋萎縮症といった幾つかの遺伝性神経疾患が、軸索性翻訳が損なわれることにより発症することが明らかになりつつある。高レベル軸索性RNAの研究の進展は、前述した軸索再生研究の進展に加え、そのような疾患の診断や予後、治療に大きな寄与をするであろう。

## 論文審査の結果の要旨

神経軸索における mRNA の局所的翻訳に関する報告は古いものは約 50 年前に遡るが、その存在

がようやく広く認められるようになったのは10年前頃である。軸索性 mRNA や軸索における局所的翻訳は、神経回路形成や軸索再生に寄与すると考えられている。また、軸索における局所的翻訳の破綻は、幾つかの遺伝性神経疾患と関わりがあることが知られている。in situ ハイブリダイゼーション (ISH) は組織内で RNA を検出する手法であるが、検出に感度の高い蛍光色素を用いない古典的な ISH のプロトコールでは、これまで軸索性 mRNA を明確に検出した例は殆ど報告されていなかった。

本研究では、古典的な ISH のプロトコールを用いて、ニワトリ後期胚 (孵卵開始 18 日目) の脳の一部の軸索において、多数の遺伝子の mRNA の非常に明瞭なシグナルを検出した。これらの遺伝子のうち、転写抑制因子 *Scratch2* およびアルツハイマー病関連タンパク質 APP に関し、詳細な解析を行ったところ、両遺伝子の軸索性アンチセンス RNA の非常に明瞭なシグナルを得た。また、両遺伝子の軸索性 mRNA および軸索性アンチセンス RNA は孵卵開始 14 日目に初めて検出されることを明らかにした。両遺伝子がコードするタンパク質は少なくとも孵卵開始 18 日目には軸索では検出されなかった。一方、マウス後期胚および新生仔の脳において、これらの遺伝子の mRNA の軸索における明瞭なシグナルは得られなかった。このことはニワトリ後期胚において見られる高レベル軸索性 RNA がユニークなものであることを示す。このような高レベル軸索性 RNA は、アフリカツメガエル後期胚の視神経においてラミン B2 の mRNA に関し報告がある。アフリカツメガエル幼生の視神経は再生能力が高いことが知られているので、今回高レベル軸索性 RNA を保持することが明らかになったニワトリ後期胚の神経軸索の再生能力が、哺乳類の神経軸索に比べ高いかどうか、興味を持たれる。更に、これらの高レベル軸索性 RNA を保持する神経細胞のうちの中脳視蓋中心灰白層大型投射ニューロンの前駆体候補である DTmesV ニューロンが、初期胚において GAP-43 陰性であることを見出した。GAP-43 は軸索伸長に重要であるとされているので、これは予想外の発見であった。このことが軸索伸長の全く未知の機構を反映しているのか、それとも、CAP-23/Basp1 のような既知の因子が機能を肩代わりしているのか、あるいは DTmesV ニューロンでは GAP-43 が他のニューロンと異なる翻訳後修飾をうけるのか、については今後の研究課題である。

以上の結果は本研究における発見が、神経発生分子機構のより正確な理解と、軸索再生を含めた再生医療に貢献するかもしれないことを示している。よって、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士 (学術) の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

1) Onodera N, Kakehata A, Araki I. (2013) Differential expression of GAP-43 protein in the rostral brain neurons of early chick embryos. *Tohoku J Exp Med.* 231(4):293-298.

#### 参考論文

1) Nakamuta S, Nakamuta N, Yamamoto Y, Onodera N, Araki I. (2015) Transient appearance of the epithelial invagination in the olfactory pit of chick embryos. *J Vet Med Sci.* 77(1) :89-93.